

10/537335

JC20 Rec'd PCT/PTO 02 JUN 2005  
5033.1012

**UNITED STATES PATENT & TRADEMARK OFFICE**

Re: Application of: **Werner KNEBEL et al.**

Serial No.: To Be Assigned

Filed: Herewith as national phase of International  
Application No. PCT/DE2003/003163, filed 23 September  
2003

For: **SCANNING MICROSCOPE COMPRISING A  
CONFOCAL SLIT SCANNER FOR  
REPRODUCING AN OBJECT**

Customer No: 23280

**LETTER RE: PRIORITY**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

June 2, 2005

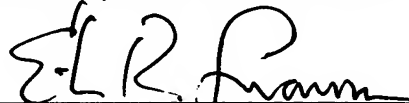
Sir:

Applicant hereby claims priority of German Application Serial No. 102 57 120.1, filed 5  
December 2002, through International Application No. PCT/DE2003/003163, filed 23  
September 2003.

Respectfully submitted,

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL, LLC

By



Erik R. Swanson  
Reg. No. 40,833

Davidson, Davidson & Kappel, LLC  
485 Seventh Avenue, 14<sup>th</sup> Floor  
New York, New York 10018  
(212) 736-1940

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



REC'D 02 DEC 2003

WIPO

PCT

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

**Aktenzeichen:**

102 57 120.1

**Anmeldetag:**

05. Dezember 2002

**Anmelder/Inhaber:**

Leica Microsystems Heidelberg GmbH,  
Mannheim/DE

**Bezeichnung:**

Rastermikroskop zum Abbilden eines Objekts

**IPC:**

G 02 B, G 01 J, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 8. Oktober 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

Scholz

4211/P/098

Heidelberg, 5. Dezember 2002/lg'

---

**Patentanmeldung**

der Firma

Leica Microsystems Heidelberg GmbH  
Am Friedensplatz 3

68165 Mannheim

betreffend ein

**„Rastermikroskop zum Abbilden eines Objekts“**

---

*Repräsentanz Spanien  
E.- 03720 Benissa, Alicante  
C/ Andalucia, M(2) - 56*

*Luisenstraße 14  
D-69115 Heidelberg  
Telefon +49 62 21/60 43-0  
Telefax +49 62 21/60 43-60  
e-mail: un@hd-patent.de*

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Rastermikroskop zum Abbilden eines Objekts, mit einer Lichtquelle, einem nahezu stufenlos variabel einstellbaren spektral selektiven Element, einer nahezu stufenlos variabel einstellbaren spektral selektiven Detektionseinrichtung, einem von der Lichtquelle bis zum Objekt verlaufenden Beleuchtungsstrahlengang, einem vom Objekt zur Detektionseinrichtung verlaufenden Detektionsstrahlengang, wobei mit dem spektral selektiven Element Licht der Lichtquelle zur Objektbeleuchtung selektierbar ist, wobei mit dem spektral selektiven Element das am Objekt reflektierte und/oder gestreute selektierte Licht der Lichtquelle aus dem Detektionsstrahlengang ausblendbar ist, wobei zumindest ein Wellenlängenbereich des im Detektionsstrahlengang verlaufenden Lichts mit der spektral selektiven Detektionseinrichtung detektierbar ist.

Unter Rastermikroskopen im Sinn der vorliegenden Erfindung sind Mikroskope zu verstehen, bei denen das abzubildende Objekt mit einem Beleuchtungsmuster abgerastert wird. Dieser Rastervorgang erfolgt üblicherweise mäanderförmig, so dass das Objekt mit dem Beleuchtungsmuster in ähnlicher Weise abgerastert wird, wie beispielsweise ein Elektronenstrahl auf den Bildschirm einer Braun'schen Röhre gelenkt wird.

Insbesondere bei biomedizinischen Anwendungen werden seit geraumer Zeit ganz besondere Rastermikroskope, nämlich konfokale Rastermikroskope, dann eingesetzt, wenn – verglichen zu konventionellen Auflicht- oder Durchlichtmikroskopen – eine verbesserte Auflösung entlang der optischen Achse benötigt wird. Bezüglich der Ausgestaltung und Einsatzmöglichkeiten konfokaler Rastermikroskope wird beispielsweise auf die Literaturstelle „Handbook of biological confocal microscopy“, Editor: J. Pawley, Plenum Press 1995 verwiesen.

Im Rahmen der deutschen Patentanmeldungen DE 43 30 347 A1 und DE 199 02 625 A1 wurde eine Möglichkeit gefunden, die Detektionseinrichtung eines herkömmlichen konfokalen Rastermikroskops durch eine nahezu stufenlos variabel einstellbare spektral selektive Detektionseinrichtung zu ersetzen. Hierzu werden die vor den Detektoren herkömmlicher konfokaler Rastermikroskope angeordneten unflexiblen Farb- oder Interferenzfilter durch den Einsatz einer entsprechenden Vorrichtung zur Selektion und Detektion mindestens zweier Spektralbereiche eines Lichtstrahls ersetzt. Hierbei wird der Lichtstrahl zunächst mit einem Prisma, einem

optischen Gitter oder einem Hologramm spektral zerlegt. Sodann wird von dem spektral zerlegten Licht ein erster Spektralbereich mit Hilfe von beweglich angeordneten Spiegelblenden selektiert und mit einem ersten Detektor detektiert. Das auf die Spiegelblenden treffende, nicht selektierte Licht wird zur Detektion mit einem zweiten Detektor reflektiert. Insoweit ist durch die in den deutschen Patentanmeldungen DE 43 30 347 A1 und DE 199 02 625 A1 beschriebenen Vorrichtungen eine Möglichkeit bekannt, auf die den Detektoren vorgeschalteten, im Hinblick auf ~~die spektrale Einstellungsmöglichkeit unflexiblen Filter zu verzichten.~~

---

Aus der DE 199 06 757 A1 ist eine optische Anordnung bekannt, mit der die dichroitischen oder multichroitischen Strahlteiler eines konfokalen Rastermikroskops ersetzt werden können. Hierbei wird mit einem nahezu stufenlos variabel einstellbaren spektral selektiven Element Licht der Laserlichtquelle mindestens einer Wellenlänge zur Objektbeleuchtung selektiert und das am Objekt reflektierte und/oder gestreute Licht der Laserlichtquelle aus dem Detektionsstrahlengang ausgeblendet. Als spektral selektives Element wird ein ansteuerbares aktives optisches Bauteil eingesetzt, das beispielsweise in Form eines AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) oder eines AOD (Acousto-Optical-Deflector) ausgeführt ist.

Insbesondere bei der konfokalen Rastermikroskopie schwach fluoreszierender Proben hat der zur Objektbeleuchtung dienende Lichtstrahl eine zu kurze Verweildauer pro abgerasterten Objektpunkt. Dementsprechend ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis des detektierten Objektpunkts in der Regel zu gering, wenn nicht sogar unbrauchbar. Insbesondere bei physiologischen Applikationen besteht ein großer Bedarf, lebende Proben zu untersuchen. Hierbei finden naturgemäß schnelle Bewegungsvorgänge statt, die nur dann in sinnvoller Weise detektiert werden können, wenn die detektierten Bilder des Objekts entsprechend schnell aufgenommen werden können. Eine derart hohe Detektionsgeschwindigkeit ergibt üblicherweise ebenfalls ein ungenügendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis der detektierten Bilddaten.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Rastermikroskop der gattungsbildenden Art derart anzugeben und weiterzubilden, dass ein Objekt auch bei einer hohen Rastergeschwindigkeit mit einem verbesserten Signal-zu-Rausch-Verhältnis detektiert werden kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren der gattungsbildenden Art löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruchs 1. Danach ist ein solches Rastermikroskop dadurch gekennzeichnet, dass der Beleuchtungsstrahlengang und der Detektionsstrahlengang im Sinn eines konfokalen Spaltscanners ausgebildet sind.

~~Erfindungsgemäß ist zunächst erkannt worden, dass eine Parallelisierung des Rastervorgangs mit dem Rastermikroskop eine längere Verweildauer des Beleuchtungslichtsstrahls auf dem Objekt zur Folge hat und somit über einen längeren Zeitraum die Detektion eines jeden Objektpunkts möglich ist. Dies wiederum ergibt ein erhöhtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis des mit der Detektionseinrichtung detektierten, vom Objekt kommenden Lichts. Eine Parallelisierung der Objektdetektion ist durch eine Ausbildung des Beleuchtungsstrahlengangs und des Detektionsstrahlengangs im Sinn eines konfokalen Spaltscanners vorgesehen.~~

Das nahezu stufenlos variabel einstellbare spektral selektive Element wie auch die nahezu stufenlos variabel einstellbare Detektionseinrichtung wird bei konventionellen Rastermikroskopen lediglich als konfokales Rastermikroskop im Sinn eines Punktscanners eingesetzt. Das heißt, das Objekt wird punktförmig abgerastert und das spektral selektive Element und die spektral selektive Detektionseinrichtung wirken auf einen punktförmigen Lichtstrahl. Sowohl das spektral selektive Element als auch die Detektionseinrichtung können jedoch auch auf einen linienförmigen Lichtstrahl in vergleichbarer Weise wirken, so dass mit diesen Komponenten auch ein Rastermikroskop im Sinn eines konfokalen Spaltscanners realisiert werden kann.

Bei einem konfokalen Spaltscanner wird das Objekt mit einem linienförmigen Beleuchtungsmuster in der Fokalebene des Mikroskopobjektivs des Rastermikroskops beleuchtet. Durch eine besondere Ausgestaltung des Detektionsstrahlengangs wird dann lediglich das vom Objekt kommende Licht detektiert, das aus dem linienförmig beleuchteten Objektbereich kommt, beispielsweise aus der Fokalebene des Mikroskopobjektivs. Ein konfokaler Spaltscanner hat eine Konfokalität in Richtung quer zur linienförmigen Objektbeleuchtung. In Richtung der linienförmigen Objektbeleuchtung liegt so gut wie keine Konfokalität vor. Durch das linien- bzw. zeilenförmige Abtasten des Objekts wird jedoch – verglichen zum zeilenweise punktförmigen

Abrasten des Objekts – bei derselben Bildrate pro Objektpunkt eine längere Beleuchtungs- und Detektionsdauer erreicht. Hierdurch können in besonders vorteilhafter Weise auch schwach fluoreszierende oder lebende Proben mit einem verbesserten Signal-zu-Rausch-Verhältnis detektiert werden.

In einer konkreten Ausführungsform ist im Beleuchtungsstrahlengang eine Beleuchtungsspaltblende vorgesehen. Die Beleuchtungsspaltblende ist hierbei vorzugsweise in einer zur Fokalebene eines Mikroskopobjektivs korrespondierenden Ebene angeordnet, so dass beleuchtungsseitig die Beleuchtungsspaltblende in die Fokalebene des Mikroskopobjektivs des Rastermikroskops abgebildet wird und somit ein linienförmiges Beleuchtungsmuster im Objektbereich generiert. Zum Abrastern des Objekts kann dieses linienförmige Beleuchtungsmuster beispielsweise mit einem im Beleuchtungsstrahlengang angeordneten schwenkbaren Spiegel relativ zum Objekt bewegt werden, indem dieser nämlich den Beleuchtungsstrahlengang in geeigneter Weise um einen Drehpunkt verkippt, der in der Eintrittspupille des Mikroskopobjektivs liegt.

Eine Detektion im Sinn eines konfokalen Spaltscanners könnte dadurch erzielt werden, dass im Detektionsstrahlengang eine Detektionsspaltblende vorgesehen ist. Die Detektionsspaltblende ist vorzugsweise in einer Ebene im Detektionsstrahlengang angeordnet, die zur Fokalebene des Mikroskopobjektivs korrespondiert. Mit anderen Worten bildet das Mikroskopobjektiv das in seiner Fokalebene angeordnete Objekt mit der zusätzlichen Optik, die eventuell im Detektionsstrahlengang zwischen Mikroskopobjektiv und Detektionsspaltblende angeordnet ist, auf die Ebene ab, in der die Detektionsspaltebene angeordnet ist. Die Detektionsspaltebene ist in der zur Fokalebene des Mikroskopobjektivs korrespondierenden Ebene derart angeordnet, dass lediglich das vom Objekt kommende Licht die Detektionsspaltblende passieren kann, das aus dem linienförmigen Beleuchtungsbereich aus der Fokalebene des Mikroskopobjektivs kommt. Insoweit liegt bezüglich der Beleuchtungsspaltblende und der Detektionsspaltblende eine konfokale Anordnung vor.

Nun kann es von Applikation zu Applikation erforderlich sein, die Form des Beleuchtungsmusters variieren zu können. So könnte lediglich ein Teil der insgesamt abbildbaren Fokalebene des Mikroskopobjektivs detektiert werden, beispielsweise in Form einer Region-of-Interest-Abbildung. Hierzu wird die Länge des linienförmigen

gen Beleuchtungsmusters entsprechend zu verkürzen sein. Andererseits könnte die Breite des linienförmigen Beleuchtungsmusters zu variieren sein, wodurch letztendlich die Auflösung der rastermikroskopischen Abbildung quer zum linienförmigen Beleuchtungsmuster verändert wird. Hierzu ist vorgesehen, dass die Spaltlänge und/oder die Spaltbreite der Beleuchtungsspaltblende und/oder der Detektionsspaltblende variabel einstellbar ist. Eine Variation der Spaltlänge und Spaltbreite erfolgt hierbei vorzugsweise unabhängig voneinander, d.h. bei einer bestimmten Spaltlänge ist lediglich die Spaltbreite der Beleuchtungsspaltblende und/oder der Detektionsspaltblende variabel einstellbar. Eine konfokale Abbildung ist stets dann sichergestellt, wenn sowohl die Beleuchtungsspaltblende als auch die Detektionsspaltblende bei einer Variation der Spaltlänge und/oder der Spaltbreite in gleicher Weise verändert werden.

Im Konkreten könnte die Beleuchtungsspaltblende und/oder die Detektionsspaltblende beweglich angeordnete Blenden umfassen. Beispielsweise ist eine Anordnung von vier rechteckförmigen Blenden denkbar, die jeweils in einer Richtung bewegt bzw. verschoben werden können, vorzugsweise motorgesteuert. Jeweils zwei der Blenden könnten mit jeweils einer Seite bzw. Kante einer Blende parallel zueinander in einer Ebene liegend angeordnet sein, wobei zwischen den beiden Seiten bzw. Kanten der Blende dann das Beleuchtungs- bzw. Detektionslicht passieren kann, also der Spalt in einer Richtung gebildet ist. Die beiden anderen Blenden könnten mit einer Seite bzw. Kante jeweils einer Blende senkrecht dazu orientiert ausgerichtet sein und im Wesentlichen in der gleichen Ebene angeordnet sein, so dass die beiden anderen Blenden den Spalt entlang der Richtung senkrecht dazu begrenzen. Eine solche Anordnung von vier Blenden ermöglicht eine Variation der Spaltlänge unabhängig von einer Variation der Spaltbreite der Beleuchtungsspaltblende und/oder der Detektionsspaltblende.

Eine Variation der Spaltlänge und/oder der Spaltbreite könnte auch durch eine jeweils der Beleuchtungsspaltblende und/oder der Detektionsspaltblende zugeordnete Vario-Optik bewirkt werden. Die Vario-Optik ist hierbei derart im Beleuchtungs- bzw. Detektionsstrahlengang angeordnet, dass die wirksame Spaltbreite und/oder die wirksame Spaltlänge der entsprechenden Spaltblende verändert werden kann. Im Konkreten könnte es sich um eine Zoom-Optik handeln, die nämlich die Gesamtvergrößerung des Beleuchtungs- bzw. Detektionsstrahlengangs von der jewei-

ligen Blende zum Objekt verändert. Eine Vario-Optik kann unter Umständen als fertig konfigurierte Baugruppe in den entsprechenden Strahlengang eingesetzt werden, so dass in vorteilhafter Weise eine mechanische Verstellung einzelner Blendenteile nicht erforderlich ist.

Das spektral selektive Element umfasst ein ansteuerbares aktives optisches Bauteil. Hierdurch ist es, eine entsprechende Ansteuerung vorausgesetzt, nahezu stufenlos variabel einstellbar. Grundsätzlich können alle aus der DE 199 06 757 A1 bekannten Ausführungsformen eines dort offenbarten spektral selektiven Elements bei dem hier vorliegenden erfindungsgemäßen Rastermikroskop zum Einsatz kommen, so dass der Offenbarungsgehalt der DE 199 06 757 A1 hier ausdrücklich hinzugezogen und insoweit als bekannt vorausgesetzt wird. Besonders bevorzugt sind als spektral selektives Element zwei AOTF-Kristalle vorgesehen, wobei eines davon das aktive optische Bauteil bildet, das mit einer entsprechenden Ultraschallwelle beaufschlagt wird. Der andere AOTF-Kristall ist als optisch inaktives Bauteil dem ersten AOTF-Kristall im Detektionsstrahlengang nachgeordnet, und zwar ist er derart angeordnet, dass er eine spektrale Zerlegung des vom Lumineszenzobjekt kommenden Lumineszenzlichts sowie eine Aufspaltung der unterschiedlichen Polarisationsrichtungen durch den ersten AOTF-Kristall rückgängig macht. Hierzu ist der zweite AOTF-Kristall bezüglich der Längsachse des ersten AOTF-Kristalls um 180 Grad verdreht angeordnet. In einer anderen Ausführungsform wird der zweite AOTF-Kristall ebenfalls mit einer Ultraschallwelle beaufschlagt. In der Anordnung dient der Kristall zur weiteren Unterdrückung des Restlichtes, das vom ersten AOTF-Kristall nicht wirksam reflektiert wurde.

Die spektral selektive Detektionseinrichtung umfasst Mittel zur spektralen Zerlegung des im Detektionsstrahlengang verlaufenden Lichts. Vorzugsweise ist dieses Mittel in Form eines Prismas ausgeführt. Alternativ könnte ein Gitter oder ein Hologramm vorgesehen sein. Weiterhin umfasst die spektral selektive Detektionseinrichtung Mittel, die einerseits zum Selektieren eines ersten Spektralbereichs zur Detektion mit einem ersten Detektor und andererseits Mittel zur Reflektion zumindest eines Teils des nicht selektierten Spektralbereichs zur Detektion mit einem zweiten Detektor aufweist. Somit durchläuft das im Detektionsstrahlengang verlaufende Licht zunächst das beispielsweise in Form eines Prismas ausgeführte Mittel zur spektralen Zerlegung und trifft dann – spektral zerlegt bzw. räumlich aufgefächert – auf das

Mittel zum Selektieren eines ersten Spektralbereichs. Der Teil des spektral zerlegten Lichts, der auf das Mittel zur Reflexion zumindest eines Teils des nicht selektierten Spektralbereichs auftrifft, wird zu einem zweiten Detektor reflektiert. Die spektral selektive Detektionseinrichtung könnte somit gemäß den Ausführungsformen, die aus den DE 43 30 347 A1 und DE 199 02 625 A1 bekannt sind, ausgeführt sein. Insoweit wird der Offenbarungsgehalt dieser deutschen Patentanmeldungen hier ausdrücklich hinzugezogen und ebenfalls insoweit als bekannt vorausgesetzt.

---

Falls die Mittel zum Selektieren des ersten Spektralbereichs bzw. die Mittel zur Reflexion zumindest eines Teils des nicht selektierten Spektralbereichs durch verschiebbar angeordnete Blenden, Spaltblenden und/oder Spiegelblenden realisiert sind, wobei eine Verschiebung bzw. mechanische Verstellung zumindest nahezu stufenlos erfolgen kann, liegt eine nahezu stufenlos variabel einstellbare spektral selektive Detektionseinrichtung vor.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform weist die Detektionseinrichtung einen flächenförmigen oder einen linienförmigen Detektor auf. Dieser Detektor weist eine seiner Flächen- oder Linienform entsprechende Ortsauflösung auf. Insoweit kann mit dem flächenförmigen oder linienförmigen Detektor das die Detektionsspaltblende passierende und spektral zerlegte und selektierte Detektionslicht auf einmal detektiert werden. Im Fall eines flächenförmigen Detektors wird in einer Richtung – parallel zur Längsseite der Detektionsspaltblende – die Ortsinformation des abgerasterten Objekts detektiert. Senkrecht dazu wird für jeden abgebildeten Objektpunkt die spektrale Komponente des Detektionslichts detektiert, die vom Mittel zur spektralen Zerlegung räumlich aufgefächert wurde.

Im Konkreten könnte der Detektor ein CCD-Element umfassen, das in Form eines CCD-Arrays bzw. CCD-Chips – also ein flächenförmiges CCD-Element – oder eines Zeilen-Photomultipliers oder einer CCD-Zeile – also ein linienförmiges CCD-Element – oder als CMOS-Element in Kombination mit einem Bildverstärker ausgebildet sein.

Falls die Form des Lichtstrahls des zu detektierenden Spektralbereichs auf die Detektorform – also beispielsweise flächen- oder linienförmig – anzupassen ist, könnte

im Detektionsstrahlengang vor einem Detektor der Detektionseinrichtung eine Adaptionsoptik angeordnet sein. Hierbei könnte es sich um eine Linse oder eine Linsenanordnung handeln, die eine Vergrößerung oder Verkleinerung oder eine weitere Abbildung bewirkt. Vorzugsweise ist die Adaptionsoptik variabel ausgeführt, beispielsweise in Form einer Zoom-Optik. Hierdurch könnte in besonders vorteilhafter Weise ein Lichtstrahl kleinerer räumlicher Ausmaße auf die volle Fläche bzw. Linie des flächen- oder linienförmigen Detektors vergrößert werden.

---

Insbesondere wenn ein linienförmiger Detektor zur Detektion des Detektionslichts eingesetzt wird, ist es von Vorteil, wenn im Detektionsstrahlengang vor einem Detektor der Detektionseinrichtung ein Mittel zum Zusammenführen des Lichts angeordnet ist, das einen im Wesentlichen linienförmigen oder fokussierten Lichtstrahl erzeugt. Das Mittel zum Zusammenführen des Lichts macht die spektrale Zerlegung bzw. räumliche Auffächerung des Mittels zur spektralen Zerlegung der spektral selektiven Detektionseinrichtung zumindest weitgehend rückgängig oder fokussiert zumindest das spektral aufgefächerte Licht auf eine Linie, der von dem linienförmigen Detektor detektiert werden kann.

Das Mittel zum Zusammenführen des Lichts könnte eine Linse, ein Prisma, ein Gitter oder ein Hologramm umfassen. Falls das Mittel zum Zusammenführen des Lichts eine Linse umfasst, wird der räumlich aufgefächerte Lichtstrahl lediglich auf eine Linie fokussiert, die spektrale Zerlegung wird mit einer Linse allein jedenfalls nicht vollständig rückgängig gemacht. Mit einem entsprechend angeordneten Prisma, Gitter oder optischen Baustein, das ein Hologramm aufweist, könnte jedoch eine spektrale Zerlegung des Mittels zur spektralen Zerlegung der Detektionseinrichtung nahezu vollständig rückgängig gemacht werden, so dass der spektral aufgefächerte Lichtstrahl durch das Mittel zum Zusammenführen des Lichts in einen linienförmigen Lichtstrahl überführt wird, der sodann von dem linienförmigen Detektor detektiert werden kann.

Insbesondere für Fluoreszenzlebensdauer-Applikationen oder Photon-Counting-Applikationen könnte der Detektor der Detektionseinrichtung eine Ausleserate aufweisen, die im  $\mu\text{s}$ - oder ns-Bereich liegt. Linien- oder zeilenförmige Detektoren, die entsprechende Ausleseraten aufweisen, sind aus dem Stand der Technik bekannt und werden insbesondere bei den obengenannten Applikationen, bei der zeitlichen

Auflösung des Abklingverhaltens von Lumineszenzpräparaten sowie bei Gasinjektionsexperimenten in Explosionskammern eingesetzt.

Insbesondere könnte der Detektor der Detektionseinrichtung eine Aktivierungseinheit aufweisen, die eine zeitliche Aktivierung und Deaktivierung des Detektors ermöglicht. Eine solche Aktivierungseinheit ist bei CCD-Arrays bzw. CCD-Chips oder CMOS-Verstärkern mit Ausleseraten im ns-Bereich durch eine Time-Gate-Schaltung realisiert, die eine Detektion des Detektors in einem vorgebbaren zeitlichen Fenster ermöglicht.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Rastermikroskop im Sinn eines Mehr-Photonen-Mikroskops ausgeführt. Dementsprechend kann das Objekt bzw. ein zur Objektmarkierung dienender Marker mit den Methoden der Mehr-Photonen-Anregung angeregt und detektiert werden. Insoweit ist eine hierzu geeignete Lichtquelle vorzusehen, beispielsweise eine ein gepulstes Licht im nahen Infrarot-Bereich emittierende Laserlichtquelle. Üblicherweise wird hierzu ein Titan-Saphir-Laser eingesetzt. Weiterhin ist das spektral selektive Element sowie die spektral selektive Detektionseinrichtung derart einzustellen, dass beispielsweise eine Zwei-Photonen-Fluoreszenzanregung mit Licht der Wellenlänge aus einem Wellenlängenbereich von 720 bis 1000 nm und eine Detektion des hiermit angeregten Fluoreszenzlichts in einem Bereich von 400 bis 600 nm erfolgt. Die Pulsdauer des von dem Titan-Saphir-Laser emittierten Lichts liegt vorzugsweise im ps-Bereich. Neben der Zwei-Photonen-Fluoreszenz sind auch noch andere nichtlineare Effekte in der Probe erzeugbar und detektierbar, wie z.B. die Erzeugung höherer Harmonischer, beispielsweise Second- oder Third Harmonic Generation, oder CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering).

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die dem Patentanspruch 1 nachgeordneten Patentansprüche und andererseits auf die nachfolgende Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung werden auch im Allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigen

Fig. 1 eine schematische Darstellung eines ersten Ausführungsbeispiels eines erfindungsgemäßen Rastermikroskops zum Abbilden eines Objekts,

Fig. 2 eine schematische Darstellung eines zweiten Ausführungsbeispiels eines erfindungsgemäßen Rastermikroskops in perspektivischer Ansicht,

---

Fig. 3 ein schematische Darstellung eines Ausschnitts aus dem Ausführungsbeispiel aus Fig. 2 in perspektivischer Ansicht,

Fig. 4 eine schematische Darstellung eines Teils einer Detektionseinrichtung eines weiteren Ausführungsbeispiels,

Fig. 5 eine schematische Darstellung eines aus dem Stand der Technik bekannten Ausführungsbeispiels eines spektral selektiven Elements und

Fig. 6 eine schematische Darstellung eines Ausführungsbeispiels eines spektral selektiven Elements gemäß der hier vorliegenden Erfindung in einer perspektivischen Ansicht.

Fig. 1 zeigt ein Rastermikroskop zum Abbilden eines Objekts 1. Das Rastermikroskop umfasst eine Laserlichtquelle 2, die zur Objektbeleuchtung des Objekts 1 dient. Der Beleuchtungsstrahlengang 3 erstreckt sich von der Laserlichtquelle 2 zum Objekt 1. Das Rastermikroskop umfasst des Weiteren eine nahezu stufenlos variabel einstellbare spektral selektive Detektionseinrichtung 4, die zumindest einen Wellenlängenbereich des im Detektionsstrahlengang 5 verlaufenden Lichts detektiert. Der Detektionsstrahlengang 5 verläuft vom Objekt 1 bis zu den Detektoren 6 und 7. Das spektral selektive Element 8 selektiert Licht der Laserlichtquelle 2 zur Objektbeleuchtung, indem es Licht einer bestimmten Wellenlänge zur Scaneinrichtung 9 reflektiert. Das nicht selektierte Licht der Laserlichtquelle 2 – beispielsweise anderer Wellenlängen – passiert das spektral selektive Element 8 und wird in der Strahlfalle 10 absorbiert. Das am Objekt 1 reflektierte und/oder gestreute selektierte Licht der Laserlichtquelle 2 wird ebenfalls vom spektral selektiven Element 8 aus

dem Detektionsstrahlengang 5 ausgeblendet, und zwar in Richtung zur Laserlichtquelle 2 abgelenkt.

Erfindungsgemäß ist der Beleuchtungsstrahlengang 3 und der Detektionsstrahlengang 5 im Sinn eines konfokalen Spaltscanners ausgebildet. Dies ist der perspektivischen Darstellung des in Fig. 2 gezeigten Ausführungsbeispiels besonders deutlich entnehmbar.

---

In Fig. 1 ist gezeigt, dass im Beleuchtungsstrahlengang 3 eine Beleuchtungsspaltblende 11 vorgesehen ist. Der von der Laserlichtquelle 2 emittierte Lichtstrahl wird von der Linse 12 in einen linienförmigen Lichtstrahl umgewandelt, der zumindest größtenteils die Beleuchtungsspaltblende 11 passiert. In Fig. 1 ist lediglich die optische Achse des linienförmigen Strahlengangs gezeigt, der Beleuchtungsstrahlengang 3 und der Detektionsstrahlengang 5 weisen einen linienförmigen Querschnitt auf, der senkrecht zur Zeichenebene angeordnet ist.

Im Detektionsstrahlengang 5 ist eine Detektionsspaltblende 13 vorgesehen, die einerseits korrespondierend zur Fokalebene 14 des Mikroskopobjektivs 15 und andererseits korrespondierend zur Beleuchtungsspaltblende 11 angeordnet ist.

Sowohl die Spaltlänge als auch die Spaltbreite der Detektionsspaltblende 13 ist variabel einstellbar, was in den Fig. 2 und 3 angedeutet ist. Die Detektionsspaltblende 13 umfasst hierbei vier beweglich angeordnete Blenden 16 bis 19. Jeweils eine Seite bzw. Kante der Blenden 16 bis 19 bilden den Spalt der Detektionsspaltblende 13. Die Blenden 16 und 17 sind entlang der mit den Doppelpfeilen 20 angedeuteten Richtungen verschiebbar. Die Blenden 18 und 19 sind entlang den mit den Doppelpfeilen 21 angedeuteten Richtungen verschiebbar. Somit kann mit den Blenden 18 und 19 die Spaltbreite der Detektionsspaltblende 13 variiert werden. Mit den Blenden 16 und 17 kann die Spaltlänge der Detektionsspaltblende 13 variiert werden.

In Fig. 1 ist gezeigt, dass zwischen der Beleuchtungsspaltblende 11 und dem spektral selektivem Element 8 eine Vario-Optik 22 angeordnet ist, mit der die wirksame Spaltbreite und die wirksame Spaltlänge der Beleuchtungsspaltblende 11 verändert werden kann. Die Vario-Optik 22 ist in Form einer Zoom-Linsen-Anordnung ausgebildet, die den Gesamt-Vergrößerungsfaktor des Beleuchtungsstrahlen-

gangs 3 – zusammen mit dem Mikroskopobjektiv 15 – variiert und somit ein größeres oder kleineres Bild der Beleuchtungsspaltblende 11 in der Fokalebene 14 des Mikroskopobjektivs 15 erzeugt.

Die in den Fig. 1 bis 4 gezeigte spektral selektive Detektionseinrichtung 4 umfasst ein Mittel 23 zur spektralen Zerlegung des im Detektionsstrahlengang 5 verlaufenden Lichts. Das Mittel 23 ist in Form eines Prismas ausgeführt. Weiterhin umfasst die in den Fig. 1 und 4 gezeigte Detektionseinrichtung 4 Mittel 24 und 40 zum Selektieren eines ersten Spektralbereichs 25. Das vom Objekt 1 kommende, mit dem Mittel 24 und 40 selektierte Licht des ersten Spektralbereichs 25 wird mit dem Detektor 6 detektiert. Das Mittel 24 ist eine verschiebbar angeordnete Blende, die mit dem Motor 26 entlang der Richtung des bei dem Mittel 24 eingezeichneten Doppelpfeils bewegbar ist.

Das Mittel 40 ist eine verschiebbar angeordnete Spiegelblende, die vom Motor 27 entlang der Richtung des bei dem Mittel 40 eingezeichneten Doppelpfeils bewegbar ist. Das am Mittel 40 reflektierte Licht ist der spektrale Anteil des vom Mittel 23 spektral zerlegten Lichts, das vom Objekt 1 kommt und das nicht für den ersten Detektor 6 selektiert ist. Dieses Licht passiert zumindest größtenteils das Mittel 28 zum Selektieren des reflektierten Spektralbereichs und wird mit dem Detektor 7 detektiert. Die in den Fig. 1 und 4 gezeigte Linse 29 kollimiert bzw. fokussiert das vom Mittel 23 spektral zerlegte Licht auf die Ebene, in der das Mittel 24 und 40 zum Selektieren des ersten Spektralbereichs 25 angeordnet ist.

In den Fig. 2 und 3 ist perspektivisch angedeutet, dass die Detektionseinrichtung 4 einen flächenförmigen Detektor 6 aufweist. Der flächenförmige Detektor 6 weist eine seiner Flächenform entsprechenden Ortsauflösung auf. Der flächenförmige Detektor 6 ist in Form eines CCD-Arrays bzw. eines CCD-Chips ausgebildet. In Fig. 3 ist ein Teil der Detektionseinrichtung 4 vergrößert gezeigt. Hierbei ist schematisch angedeutet, dass entlang der Richtung 30 die Ortsinformation des vom Objekt 1 kommenden Lichts entlang des linienförmigen Beleuchtungsmusters detektierbar ist. Entlang der Richtung 31 ist die spektrale Information eines jeden detektierten Objektpunkts auf den Detektor 6 abgebildet. Zur besseren Anschauung sind Linsen und andere optische Mittel, die zur Führung und Formung des Lichtes notwendig sind, in den Figuren weggelassen.

Der in den Fig. 2 und 3 gezeigte, als CCD-Array ausgebildete Detektor 6 weist eine Auslesegeschwindigkeit von 100 Bildern pro Sekunde auf. Bei einer Objektbildgröße von 512 x 512 Pixeln ist für eine gesamte Objektbildaufnahme der Detektor 6 512 mal auszulesen. Somit ergibt sich eine Gesamtaufnahmedauer eines Objektbils von ca. 5 Sekunden. Die Rastergeschwindigkeit der Scaneinrichtung 9 ist mit der Auslesegeschwindigkeit des Detektors 6 synchronisiert bzw. darauf angepasst. Somit liegt als Objektrepräsentation eines einmal-abgerasterten Objekts 1 bei der obengenannten Bildgröße von 512 x 512 Pixel – sowohl die Ortsinformation als auch die spektrale Information eines jeden Bildpunkts vor.

In Fig. 4 ist ein weiteres Ausführungsbeispiel einer Detektionseinrichtung 4 gezeigt, bei der zwischen den Mitteln 24, 40 zum Selektieren eines ersten Spektralbereichs 25 und dem Detektor 32 ein Mittel 33 zum Zusammenführen des Lichts, das die Mittel 24, 40 zum Selektieren des ersten Spektralbereichs 25 passiert, angeordnet ist. Das Mittel 33 zum Zusammenführung des Lichts ist in Form eines Prismas ausgebildet und erzeugt einen linienförmigen Lichtstrahl, der von dem als CCD-Zeile ausgebildeten Detektor 32 detektiert wird. In gleicher Weise ist zwischen dem Mittel 28 zum Selektieren des reflektierten Spektralbereichs und dem Detektor 34 ein Mittel 33 zum Zusammenführen des dort verlaufenden Lichts vorgesehen, so dass durch das Mittel 33 zum Zusammenführen des Lichts ebenfalls ein linienförmiger Lichtstrahl erzeugt wird, der mit dem in Form einer CCD-Zeile ausgebildeten, linienförmigen Detektor 34 detektiert wird.

Die Fig. 5 und 6 zeigen eine Detailvergrößerung eines spektral selektiven Elements 8. Der im Querschnitt punktförmige Lichtstrahl des Lichts der Laserlichtquelle 2 trifft auf einen Spiegel 35, der das Licht in einen ersten AOTF-Kristall 36 reflektiert. Falls der AOTF-Kristall 36 derart eingestellt ist, dass kein Licht der Laserlichtquelle 2 zur Objektbeleuchtung selektiert wird, durchläuft dieses Licht den ersten AOTF-Kristall 36 derart, dass es vollständig von der Strahlfalle 10 absorbiert wird. Falls der erste AOTF-Kristall derart eingestellt wird, dass beispielsweise Licht einer Wellenlänge zur Objektbeleuchtung selektiert wird, durchläuft dieses Licht den ersten AOTF-Kristall 36 abgelenkt – in die 1. Ordnung gebeugt –, so dass es in den Beleuchtungsstrahlengang 3 eintritt und zur Objektbeleuchtung genutzt wird, was durch den unteren Pfeil auf das Objekt 1 angedeutet ist. Das am Objekt 1 reflektierte und/oder ge-

streute selektierte Licht der Laserlichtquelle 2 durchläuft den ersten AOTF-Kristall 36 in umgekehrter Richtung, trifft sodann – in die 1. Ordnung gebeugt – auf den Spiegel 35, der das vom Objekt kommende reflektierte und/oder gestreute Licht zur Laserlichtquelle 2 reflektiert. Das vom Objekt 1 kommende Fluoreszenzlicht durchläuft den ersten AOTF-Kristall 36 in der 0. Ordnung und passiert den Spiegel 35 hin zum zweiten AOTF-Kristall 37. Der AOTF-Kristall 37 ist um die schematisch ange deutete – optische – Achse 38 um 180 Grad gedreht angeordnet. Somit macht der ~~zweite AOTF-Kristall 37 eine spektrale Zerlegung des ersten AOTF-Kristalls 36 des~~ Fluoreszenzlichts sowie eine Polarisationsaufspaltung rückgängig. Die beiden Spiegel 39 dienen lediglich dazu, das die AOTF-Kristalle 36, 37 durchlaufene Licht wieder coaxial zur optischen Achse 38 zu bringen.

Fig. 6 zeigt in einer perspektivischen Darstellung die Funktionsweise des spektral selektiven Elements 8 bei dem erfindungsgemäßen konfokalen Rastermikroskop, das im Sinn eines konfokalen Spaltscanners arbeitet. Hierbei kommt von der Laserlichtquelle 2 ein im Querschnitt linienförmig ausgebildeter Lichtstrahl, der vom Spiegel 35 zum ersten AOTF-Kristall 36 reflektiert wird. Die weitere Funktionsweise des in Fig. 6 gezeigten spektral selektiven Elements 8 entspricht im Wesentlichen dem des in Fig. 5 gezeigten spektral selektiven Elements 8, wobei sowohl der in Fig. 6 gezeigte Teil des Beleuchtungsstrahlengangs 3 als auch der dort gezeigte Teil des Detektionsstrahlengangs 5 jeweils einen linienförmigen Querschnitt aufweist.

Abschließend sei ganz besonders darauf hingewiesen, dass die voranstehend erörterten Ausführungsbeispiele lediglich zur Beschreibung der beanspruchten Lehre dienen, diese jedoch nicht auf die Ausführungsbeispiele einschränken.

## Patentansprüche

1. Rastermikroskop zum Abbilden eines Objekts (1), mit einer Lichtquelle (2), einem nahezu stufenlos variabel einstellbaren spektral selektiven Element (8), einer nahezu stufenlos variabel einstellbaren spektral selektiven Detektionseinrichtung (4), einem von der Lichtquelle (2) bis zum Objekt (1) verlaufenden Beleuchtungsstrahlengang (3), einem vom Objekt (1) zur Detektionseinrichtung (4) verlaufenden Detektionsstrahlengang (5), wobei mit dem spektral-selektiven-Element (8) Licht der Lichtquelle (2) zur Objektbeleuchtung selektierbar ist, wobei mit dem spektral selektiven Element (8) das am Objekt (1) reflektierte und/oder gestreute selektierte Licht der Lichtquelle (2) aus dem Detektionsstrahlengang (5) ausblendbar ist, wobei zumindest ein Wellenlängenbereich des im Detektionsstrahlengang (5) verlaufenden Lichts mit der spektral selektiven Detektionseinrichtung (4) detektierbar ist, dadurch gekennzeichnet, dass der Beleuchtungsstrahlengang (3) und der Detektionsstrahlengang (5) im Sinn eines konfokalen Spaltscanners ausgebildet sind.
2. Rastermikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass im Beleuchtungsstrahlengang (3) eine Beleuchtungsspaltblende (11) vorgesehen ist.
3. Rastermikroskop nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass im Detektionsstrahlengang (5) eine Detektionsspaltblende (13) vorgesehen ist.
4. Rastermikroskop nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Spaltlänge und/oder die Spaltbreite der Beleuchtungsspaltblende (11) und/oder der Detektionsspaltblende (13) variabel einstellbar ist.
5. Rastermikroskop nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Beleuchtungsspaltblende (11) und/oder die Detektionsspaltblende (13) beweglich angeordnete Blenden (16, 17, 18, 19) umfasst, wobei vorzugsweise eine Seite einer jeden Blende (16, 17, 18, 19) den Spalt der Beleuchtungsspaltblende (11) bzw. der Detektionsspaltblende (13) bildet.
6. Rastermikroskop nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Beleuchtungsspaltblende (11) und/oder der Detektionsspaltblende (13) jeweils eine

Vario-Optik (22) zugeordnet ist, mit der die wirksame Spaltbreite und/oder die wirksame Spatlänge der Beleuchtungsspaltblende (11) bzw. der Detektionsspaltblende (13) veränderbar ist bzw. sind.

7. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das spektral selektive Element (8) ein ansteuerbares aktives optisches Bauteil umfasst, vorzugsweise einen AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) oder einen AOD (Acousto-Optical-Deflector).

---

8. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die spektral selektive Detektionseinrichtung (4) Mittel (23) zur spektralen Zerlegung des im Detektionsstrahlengang (5) verlaufenden Lichts – vorzugsweise in Form eines Prismas –, Mittel (24, 40) zum Selektieren eines ersten Spektralbereichs (25) zur Detektion mit einem ersten Detektor (6) und Mittel (24, 40) zur Reflexion zumindest eines Teils des nicht selektierten Spektralbereichs zur Detektion mit einem zweiten Detektor (7) aufweist.

9. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektionseinrichtung (4) einen flächenförmigen oder einen linienförmigen Detektor (6, 7, 32, 34) aufweist, der eine seiner Flächen- oder Linienform entsprechende Ortsauflösung aufweist.

10. Rastermikroskop nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor (6, 7, 32, 34) ein CCD-Element umfasst, das in Form eines CCD-Arrays oder einer CCD-Zeile ausgebildet ist.

11. Rastermikroskop nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass im Detektionsstrahlengang (5) vor einem Detektor (6, 7, 32, 34) der Detektionseinrichtung (4) eine – vorzugsweise variierbare – Adaptionsoptik angeordnet ist, mit der die Form des Lichtstrahls des zu detektierenden Spektralbereichs auf die Detektorform anpassbar ist.

12. Rastermikroskop nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass im Detektionsstrahlengang (5) vor einem Detektor (32, 34) der Detektionseinrich-

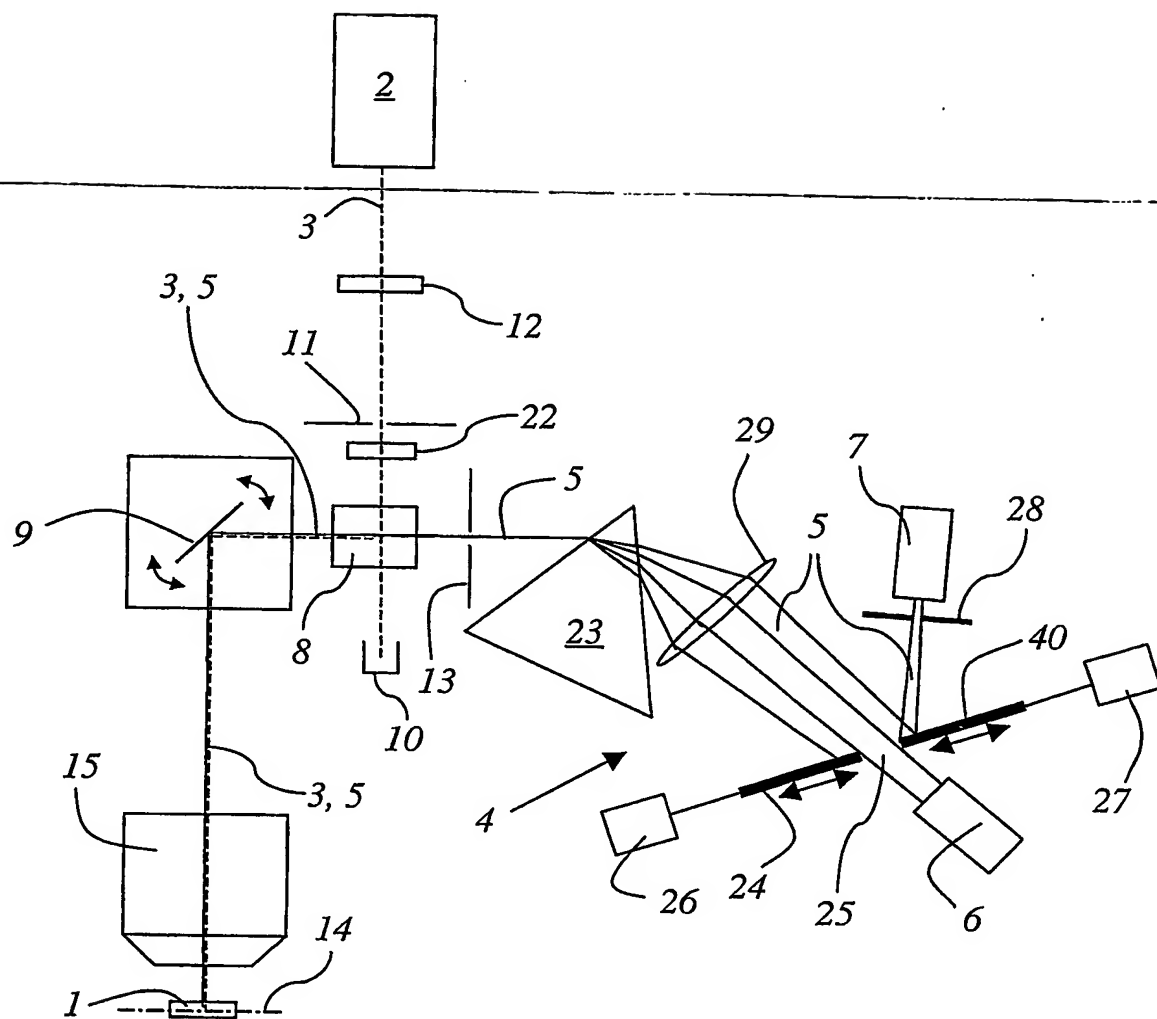
tung (4) ein Mittel (33) zum Zusammenführen des Lichts angeordnet ist, das einen im Wesentlichen linienförmigen oder fokussierten Lichtstrahl erzeugt.

13. Rastermikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel (33) zum Zusammenführen des Lichts eine Linse, ein Prisma, ein Gitter oder ein Hologramm umfasst.

~~14. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet,~~  
net, dass der Detektor (6, 7, 32, 34) der Detektionseinrichtung (4) eine Ausleserate aufweist, die im  $\mu$ s- oder ns-Bereich liegt, so dass vorzugsweise Fluoreszenzlebensdauerexperimente und/oder Abklingverhalten von Lumineszenzpräparaten zeitlich aufgelöst werden können.

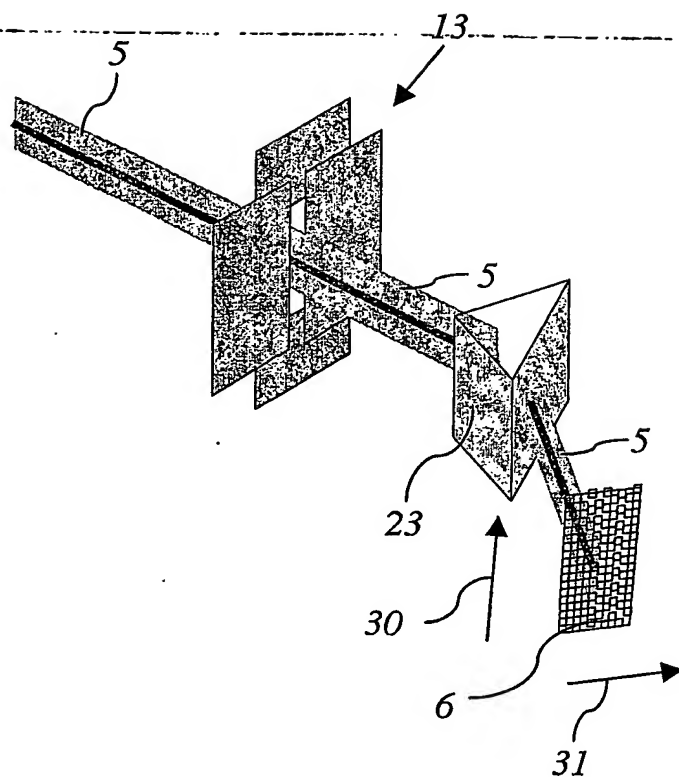
15. Rastermikroskop nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor (6, 7, 32, 34) der Detektionseinrichtung (4) eine Aktivierungseinheit aufweist, die eine zeitliche Aktivierung und Deaktivierung des Detektors ermöglicht.

16. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 15, gekennzeichnet durch eine Mehr-Photonen-Anregung des Objekts (1) oder eines zur Objektmarkierung dienenden Markers.

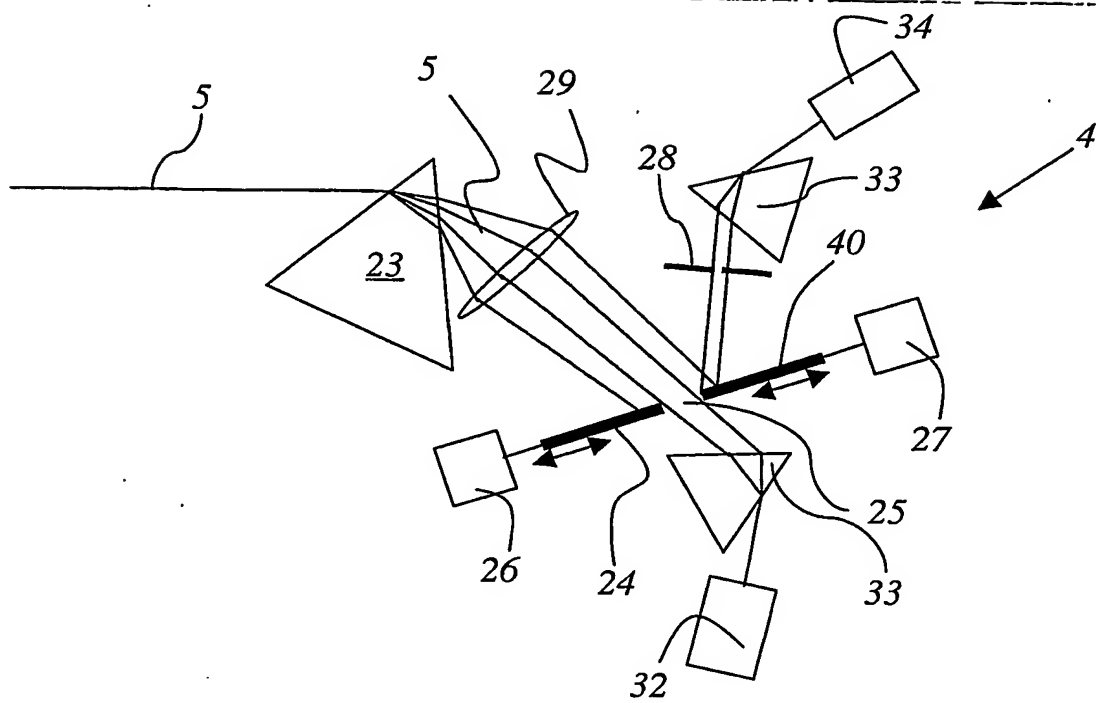


**Fig. 1**

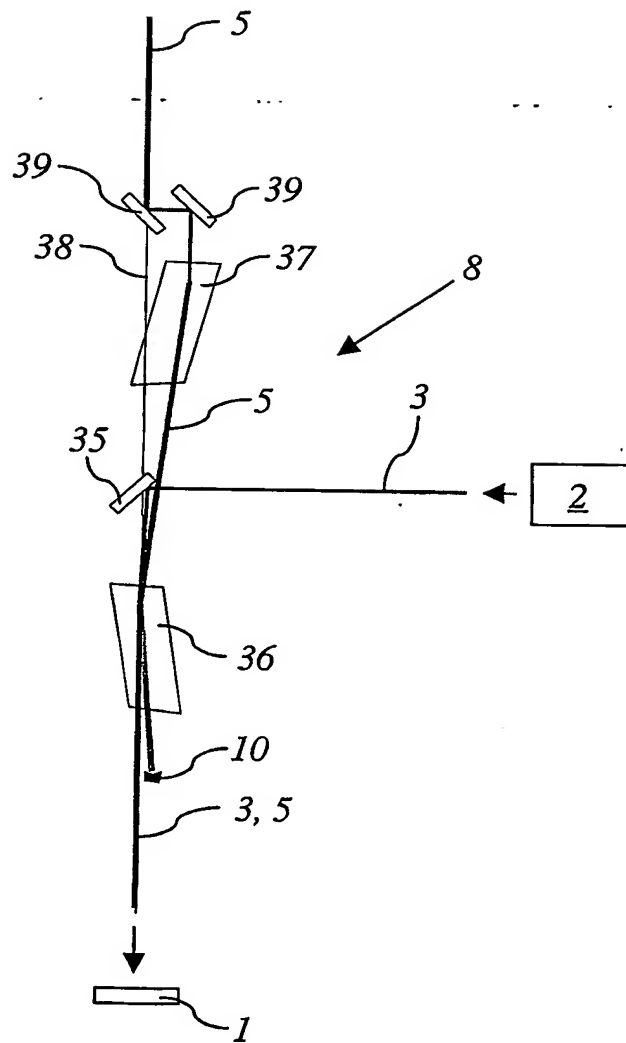




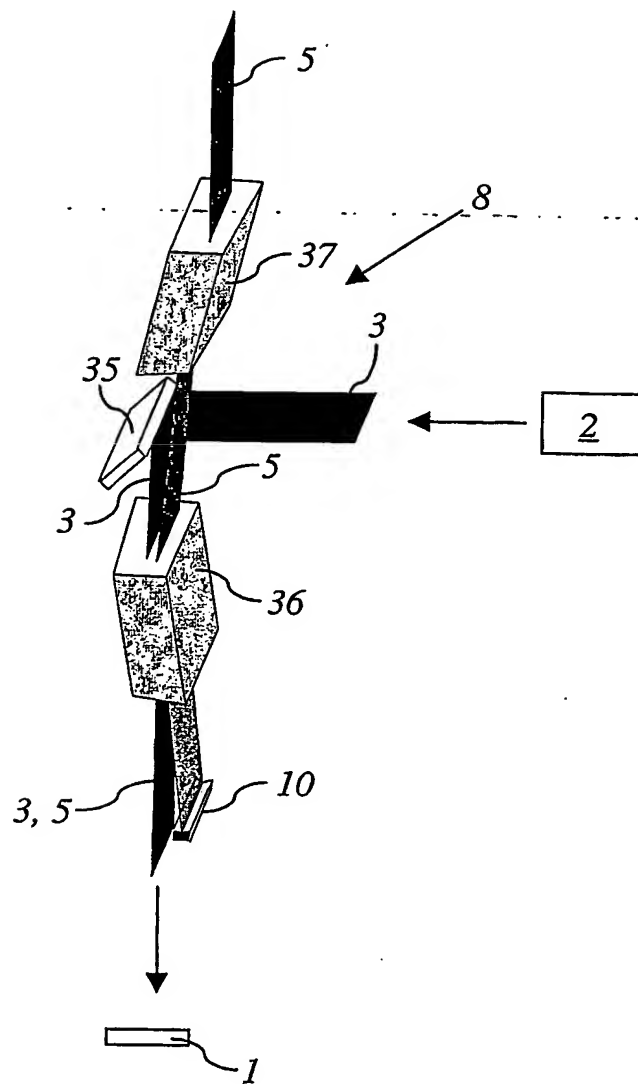
**Fig. 3**



**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**

## Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Rastermikroskop zum Abbilden eines Objekts (1), mit einer Lichtquelle (2), einem nahezu stufenlos variabel einstellbaren spektral selektiven Element (8), einer nahezu stufenlos variabel einstellbaren spektral selektiven Detektionseinrichtung (4), einem von der Lichtquelle (2) bis zum Objekt (1) verlaufenden Beleuchtungsstrahlengang (3), einem vom Objekt (1) zur Detektionseinrichtung (4) verlaufenden Detektionsstrahlengang (5), wobei mit dem spektral selektiven Element (8) Licht der Lichtquelle (2) zur Objektbeleuchtung selektierbar ist, wobei mit dem spektral selektiven Element (8) das am Objekt (1) reflektierte und/oder gestreute selektierte Licht der Lichtquelle (2) aus dem Detektionsstrahlengang (5) ausblendbar ist, wobei zumindest ein Wellenlängenbereich des im Detektionsstrahlengang (5) verlaufenden Lichts mit der spektral selektiven Detektionseinrichtung (4) detektierbar ist, und ist zur Detektion eines Objekts (1) bei einer hohen Rastergeschwindigkeit bei einem verbesserten Signal-zu-Rausch-Verhältnis dadurch gekennzeichnet, dass der Beleuchtungsstrahlengang (3) und der Detektionsstrahlengang (5) im Sinn eines konfokalen Spaltscanners ausgebildet sind.

(Fig. 2)



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**